

204-12 2024-08-06



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для типирования генов гистосовместимости
человека (HLA) II класса
методом амплификации ДНК

HLA-ДНК-ТЕХ

Комплект реагентов для типирования гена DQA1

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03891 от 02 августа 2024 года

Фасовка:
универсальная (U)

Каталожный номер:
R1-H002-N3/5

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 НАЗНАЧЕНИЕ	5
2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА	5
2.1 Принцип действия	5
2.2 Количество определений	7
2.3 Состав комплекта	8
2.4 Время проведения анализа	8
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
3.1 Специфичность анализа	8
3.2 Чувствительность анализа	9
3.3 Диагностическая специфичность	9
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	10
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	12
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	13
6.1 Материал для исследования	13
6.2 Взятие цельной периферической крови	13
6.3 Транспортирование и хранение исследуемого материала	13
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	14
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	14
7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции	14
7.3 Загрузка теста «DQA1» для детектирующих амплификаторов при первой постановке на данном компьютере	17
7.4 Ежедневная работа с тестом «DQA1»	19
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	23
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	25
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ КОМПЛЕКТА	28
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	29
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	29
Приложение А	31

ВВЕДЕНИЕ

Система генов тканевой совместимости человека (HLA) является одной из наиболее полиморфных генетических систем, выполняющей в организме человека ряд функций. Обеспечивая регуляцию иммунного ответа, система HLA осуществляет генетический контроль взаимодействия всех иммунокомпетентных клеток организма, распознавание своих и чужеродных (в том числе измененных собственных) клеток, запуск и реализацию иммунного ответа и, в целом, обеспечивает выживание человека как вида в условиях экзогенной и эндогенной агрессии. Многообразие указанных функций обеспечивается особенностями строения главного комплекса гистосовместимости. Одна из этих особенностей – выраженный аллельный полиморфизм комплекса генов HLA.

Комплекс генов HLA компактно расположен на коротком плече 6 аутосомной хромосомы и занимает 3500 килобаз (kb). В состав HLA входит три группы генов, кодирующие, соответственно, три группы белковых продуктов (молекул). Молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса (A, B, C) присутствуют на поверхности всех типов клеток, кроме эритроцитов и клеток трофобласта, они участвуют в процессе презентации пептидов мутантных, трансформированных и инфицированных вирусом клеток собственного организма, и соответственно дальнейшей элиминации таких клеток. Молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса (DP, DM, DQ, DR) участвуют в процессе презентации чужеродных пептидов, например бактериальных, и соответственно в процессе развития иммунного ответа. Такие молекулы экспрессируются лишь немногими типами клеток, выполняющими функции антигенпредставляющих клеток (АПК), а именно В-лимфоцитами, активированными Т-клетками, макрофагами, дендритными клетками и клетками Лангерганса. Молекулы главного комплекса гистосовместимости III класса являются компонентами системы комплемента и других белков, присутствующих в крови.

Научное обоснование

Ген HLA-DQA1 относится к генам гистосовместимости человека (HLA) II класса, обладает выраженным полиморфизмом. Известно более 70 аллелей данного гена (8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601)). Генотипирование по локусу DQA1 на уровне групп аллелей (low resolution, низкое разрешение) достаточно для большинства приложений результатов генотипирования, в частности используется для подбора тканесовместимых донора и реципиента при первичных трансплантациях органов, например почек. Показано, что такой уровень генотипирования является достаточным и соответствует стандартам передовых трансплантологических центров мира.

Медицинское обоснование

Трансплантация органов и тканей. Генотипирование по локусам DRB1, DQA1 и DQB1 на уровне групп аллелей используется для подбора тканесовместимых донора и реципиента при первичных трансплантациях органов, для подбора потенциального донора при родственных пересадках гемопоэтических стволовых клеток, а также для первичного скрининга потенциального донора при неродственных пересадках гемопоэтических стволовых клеток.

Репродуктивные проблемы. Различие супругов по вариантам генов HLA является одним из важных условий успешного наступления и вынашивания беременности. Сходство супругов между собой по вариантам HLA ведёт к увеличению вероятности появления зародыша с двойным набором одинаковых вариантов генов, то есть HLA-гомозигот, что является неблагоприятным фактором, следствием чего могут быть репродуктивные потери. Поэтому для диагностики причин репродуктивных неудач используют HLA-типирование супругов, чтобы установить сходство между ними по вариантам генов HLA.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Набор реагентов HLA-ДНК-ТЕХ предназначен для определения специфичностей главного комплекса тканевой совместимости человека на уровне генов методом полимеразной цепной реакции в биологическом материале человека (периферическая кровь) с использованием детектирующих амплификаторов.

Полученные результаты могут быть использованы для подбора гистосовместимого донора при трансплантации органов и тканей, для генетического прогнозирования иммуноопосредованных заболеваний и нарушений репродукции.

- 1.2** Комплект реагентов для типирования гена DQA1 предназначен для одновременного определения 8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601) главного комплекса тканевой совместимости человека.

- 1.3** Комплект реагентов может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

- 2.1** Принцип действия

Исследования проводятся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В основе работы комплекта реагентов лежит принцип амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров, комплементарных специфическому участку ДНК и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на

флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В некоторые смеси для амплификации введены сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки Fam и Hex. После окончания ПЦР проводится раунд температурного плавления дуплексов, образованных ампликонами и сигнальными зондами, в результате чего изменяется уровень флуоресценции, который фиксируется и представляется программным обеспечением прибора в виде графика. Если сигнальный зонд частично комплементарен ДНК-мишени, температура плавления такого дуплекса будет ниже температуры плавления дуплекса в случае полной комплементарности зонда. На основании совокупных данных о пороговых циклах амплификации и температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

Комплект реагентов для типирования гена DQA1 включает смеси для амплификации, специфичные для 8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601), в состав которых в том числе входит внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции специфичностей гена DQA1, включены флуоресцентные метки Fam, Hex и Rox. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца (ВК), входит флуоресцентный краситель Cy5 (таблица 1). Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Название смеси для амплификации	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
DQA1-1	0301	0501	0201	ВК	-
DQA1-2	-	-	0401, 0601	ВК	-
DQA1-3	-	-	0101, 0102, 0103	ВК	-
DQA1-4	-	-	0103, 0102, 0101	ВК	-

Для контроля качества проведения исследования используют контрольные образцы «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX», представляющие собой смеси клонированных участков генов HLA-DQA1 и HLA-DQB1, выявляемых с применением комплекта.

Исследование с использованием комплекта реагентов для типирования гена DQA1 состоит из этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация в режиме реального времени.

2.2

Комплект реагентов рассчитан на 24 определения, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Состав комплекта

Комплект реагентов для типирования гена DQA1 выпускается в универсальной фасовке (маркируется – фасовка U) и включает следующие компоненты:

- смеси для амплификации:
 - DQA1-1 – 1 пробирка (480 мкл);
 - DQA1-2 – 1 пробирка (480 мкл);
 - DQA1-3 – 1 пробирка (480 мкл);
 - DQA1-4 – 1 пробирка (480 мкл);
- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 500 мкл);
- полимеразы ТехноТaq MAX – 1 пробирка (48 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец «K+ DQ FAM» – 1 пробирка (100 мкл);
- положительный контрольный образец «K+ DQ HEX» – 1 пробирка (100 мкл);

2.4 Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки) – от 2,5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность анализа

Комплект реагентов для типирования гена DQA1 выявляет следующие 8 аллелей (DQA1*0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0103, *0301, *0401, *0501, *0601). Перечень выявляемых аллелей приведён в таблице 2.

В образцах биологического материала человека после завершения реакции амплификации программное обеспечение для приборов ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96 определяет генотип исследуемого образца. Интерпретация результатов анализа проводится ПО автоматически.

¹ – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2

² – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6

Таблица 2 – Обозначение аллелей и групп аллелей

Обозначение аллеля / группы аллелей	Аллели, входящие в группу	
	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой до 1 апреля 2010 г.	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой с 1 апреля 2010 г.
DQA1*0101	DQA1*0101/*0104/*0105/*0107/*0112	DQA1*01:01/*01:04/*01:05/*01:07/01:12
DQA1*0102	DQA1*0102/*0106/0108/*0109/*0111	DQA1*01:02/*01:06/*01:08/*01:09/*01:11
DQA1*0103	DQA1*0103/*0110	DQA1*01:03/*01:10
DQA1*0201	DQA1*0201	DQA1*02:01
DQA1*0301	DQA1*0301 - *0303	DQA1*03:01 - *03:03
DQA1*0401	DQA1*0401 - *0404	DQA1*04:01 - *04:04
DQA1*0501	DQA1*0501 - *0511	DQA1*05:01 - *05:11
DQA1*0601	DQA1*0601/*0602	DQA1*06:01/*06:02

3.2 Чувствительность анализа

Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу комплекта реагентов.

Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ) производства ООО «НПО ДНК-Технология».

Примечание – При использовании комплекта реагентов для типирования гена DQA1 совместно с комплектом реагентов для типирования гена DRB1 можно учитывать результаты определения КВМ, полученные при использовании комплекта реагентов для типирования DRB1. Если полученное для КВМ значение Ср более 32,0, оператор должен трактовать это как недостаточное для анализа количество ДНК.

3.3 Диагностическая специфичность составляет 100 (98,7 – 100) %.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические ПЦР исследования клинического материала с соблюдением методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

К работе с комплектом реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в ламинарных шкафах с включённым ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием комплекта реагентов следует проводить в ПЦР-боксах.

При работе с комплектами реагентов при удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) запрещается открытие пробирок, так как это может привести к разбрызгиванию содержимого и контаминации продуктами ПЦР оборудования, реагентов и лабораторной зоны.

Дозаторы, используемые при работе с комплектом, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

При использовании комплекта реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий

Не использовать комплект реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к комплекту реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки;
- по истечению срока годности комплекта реагентов.

Примечание – Комплект реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения исследования с использованием комплекта реагентов для типирования гена DQA1 требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий (ДТлайт¹, ДТпрайм² или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»));
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 0,2 мл для амплификации или стрипованные пробирки (стрипы) объёмом 0,2 мл для амплификации;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок (стрипов) объёмом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл и 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА или ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА (ООО «НПО ДНК-Технология»)).

Программное обеспечение для детектирующих амплификаторов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

- версия ПО не ниже 7.5.5.23;
- файл с параметрами анализа «HLA.ini» (версия не ниже «HLA_20131111.ini»).

¹ – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2

² – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту для выделения ДНК из биологического материала.

6.2 Взятие цельной периферической крови

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объемом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.3 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА и ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА. Комплект ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА рекомендуется использовать в случае, если предполагается длительное хранение выделенной ДНК (до шести месяцев). ДНК, полученную с использованием комплекта ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, следует хранить не более одного месяца.

Полученную ДНК также можно использовать для определения генетических полиморфизмов.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для типирования гена DQA1 можно узнать у представителя компании.

Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из периферической крови необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объёме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК).

7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1 Промаркируйте по 4 пробирки для амплификации объёмом 0,2 мл для каждого анализируемого образца и отрицательного контрольного образца (K-), положительного контрольного образца «K+ DQ FAM» и положительного контрольного образца «K+ DQ HEX».

Пример: Необходимо проанализировать пять образцов. Нужно промаркировать 20 пробирок для исследуемых образцов и 12 пробирок для «K-», «K+ DQ FAM» и «K+ DQ HEX». Общее количество пробирок – 32.

- 7.2.2 Встряхните пробирки со смесями для амплификации в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.3 Внесите в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (соответственно маркировке в пробирку 1 внесите смесь DQA1-1, в пробирку 2 – смесь DQA1-2 и т.д.).
- 7.2.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq МАХ в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.2.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера;
 - 0,5 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТaq МАХ,
- где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К–», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX».

Пример: Необходимо проанализировать пять образцов, «К–», «К+ DQ FAM» и «К+ DQ HEX». Промаркированных пробирок – 32. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ для 33 (32+1) пробирок, т.е. 330 мкл ПЦР-буфера + 16,5 мкл полимеразы ТехноТaq МАХ.

- 7.2.6 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием.

- 7.2.7 Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ в пробирки со смесями для

амплификации необходимо в течение двух часов выполнить 7.2.8 – 7.2.13.

7.2.8 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

7.2.9 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (4 шт. для каждого образца) по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК.

7.2.10 Внесите в пробирки, маркированные «К-», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК. Внесите в пробирки, маркированные «К+ DQ FAM», по 5,0 мкл положительного контрольного образца «К+ DQ FAM». Внесите в пробирки, маркированные «К+ DQ HEX», по 5,0 мкл положительного контрольного образца «К+ DQ HEX».

7.2.11 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.2.12 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

7.2.13 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «HLA.ini» (7.3). Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тест «DQA1» (7.4), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе положительных и отрицательных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (7.4.6) и проведите ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Версия ini файла должна быть не ниже «HLA_20131111.ini».

При выборе теста «DQA1» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Δt, °C	Тип блока
1	80,0	2	00	1			Цикл
	94,0	5	00				
2	94,0	0	30	5			Цикл
	64,0	0	15		√		
3	94,0	0	10	45			Цикл
	64,0	0	15		√		
4	94,0	0	5	1			Цикл
5	25,0	0	30	1			Цикл
6	25,0	0	15	50	√	1,0 °C	«Кривая плавления», Δt=1 °C; Ткон=75 °C
7	10,0 ¹	...	...	Хранение			Хранение

7.3 Загрузка теста «DQA1» для детектирующих амплификаторов при первой постановке на данном компьютере

ВНИМАНИЕ!

1. Версия теста «DQA1» должна быть не ниже 2.1.
2. Версия ПО не ниже 7.5.5.23.

Примечание – Для иллюстраций настоящей инструкции использованы скриншоты версии 7.9.5.25.

Тест «DQA1» (файл «HLA.ini») для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляется производителем комплекта. Его установку в программу RealTime_PCR

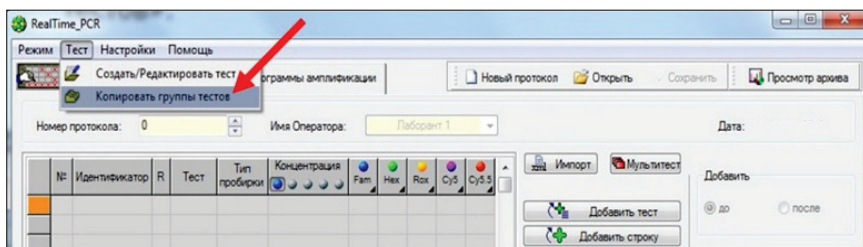
¹ – допускается хранение при температуре 25 °C

необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

- 7.3.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом реагентов для типирования гена DQA1, выберите режим «Работа с прибором».

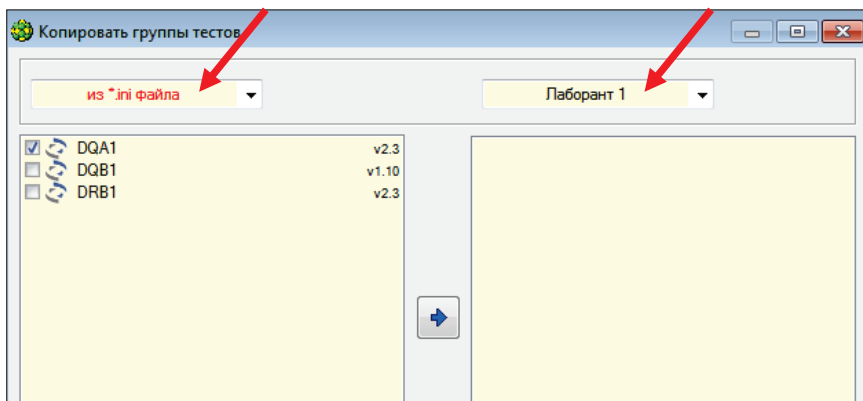
При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

- 7.3.2 В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».

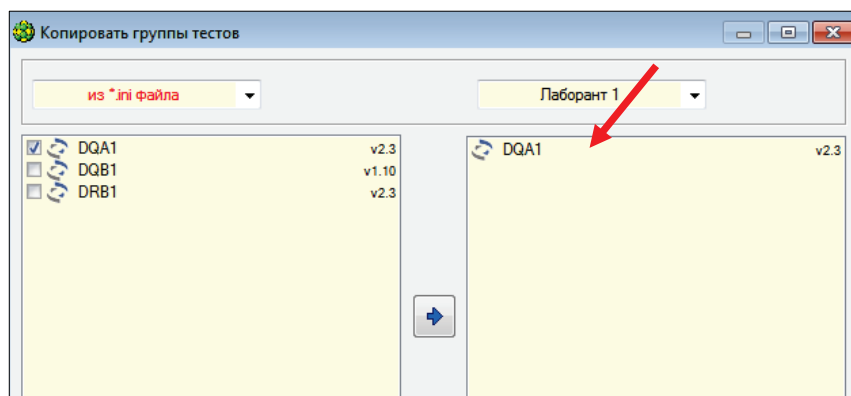


- 7.3.3 В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «HLA.ini».

- 7.3.4 В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которому необходимо скопировать тест «DQA1».



- 7.3.5 Выберите тест для копирования. Нажмите кнопку , после чего выбранный тест появится в правой половине окна.

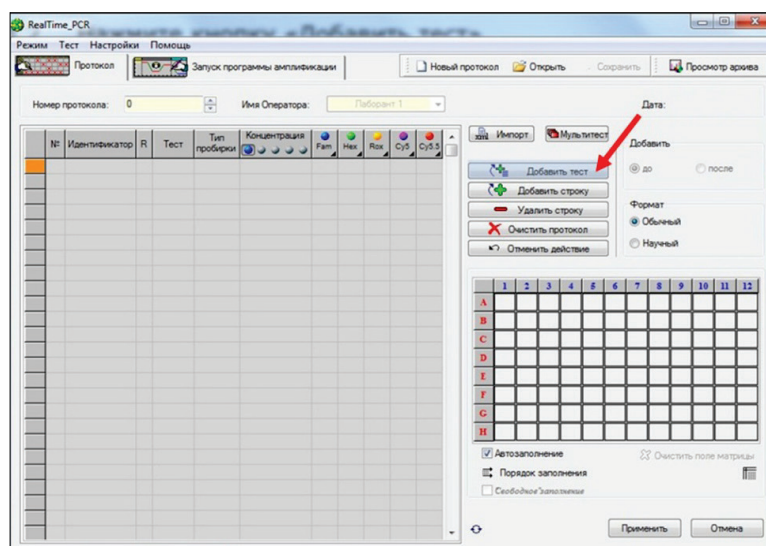


Теперь с тестом «DQA1» может работать оператор, для которого был скопирован тест.

7.4 Ежедневная работа с тестом «DQA1»

- 7.4.1 Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тест (см. 7.3.4), выберите режим «Работа с прибором».

- 7.4.2 Нажмите кнопку «Добавить тест».



7.4.3 Выберите из списка тест «DQA1».

Добавить тест

Тест: **DQA1** v2.3 Все тесты

Описание: HLA

Тип анализа: HLA DQ

1. Образцы: Количество: 1 (x4) Дубли: 1

2. Стандарты: ☐ Значения стандартов из другого протокола
Количество: 0 Дубли: 1

3. Контроли: Положительные (K+): 0 (x4)
Отрицательные (K-): 0 (x4)

Подробнее Добавить Ок Отмена

7.4.4 Укажите количество исследуемых образцов (отрицательные и положительные контрольные образцы следует указывать как образцы), нажмите кнопку «Ок».

Добавить тест

Тест: **DQA1** v2.3 Все тесты

Описание: HLA

Тип анализа: HLA DQ

1. Образцы: Количество: 8 (x4) Дубли: 1

2. Стандарты: ☐ Значения стандартов из другого протокола
Количество: 0 Дубли: 1

3. Контроли: Положительные (K+): 0 (x4)
Отрицательные (K-): 0 (x4)

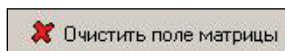
Подробнее Добавить Ок Отмена

7.4.5 Укажите идентификаторы пробирок.

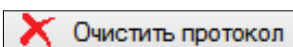
	№	Идентификатор	Тест	Fam	Hex	Rox	Cy5
A1	1	Образец_1	DQA1	0301	0501	0201	BK
A2	2			-	-	0401, 0601	BK
A3	3			-	-	0101, 0102, 0103	BK
A4	4			-	-	0103, 0102, 0101	BK
A5	5	Образец_2	DQA1	0301	0501	0201	BK
A6	6			-	-	0401, 0601	BK
A7	7			-	-	0101, 0102, 0103	BK
A8	8			-	-	0103, 0102, 0101	BK
A9	9	Образец_3	DQA1	0301	0501	0201	BK
A10	10			-	-	0401, 0601	BK
A11	11			-	-	0101, 0102, 0103	BK
A12	12			-	-	0103, 0102	BK

7.4.6 Отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при ошибочном заполнении нажмите кнопки

«Очистить поле матрицы» –



или «Очистить протокол» –



и «Порядок заполнения» –



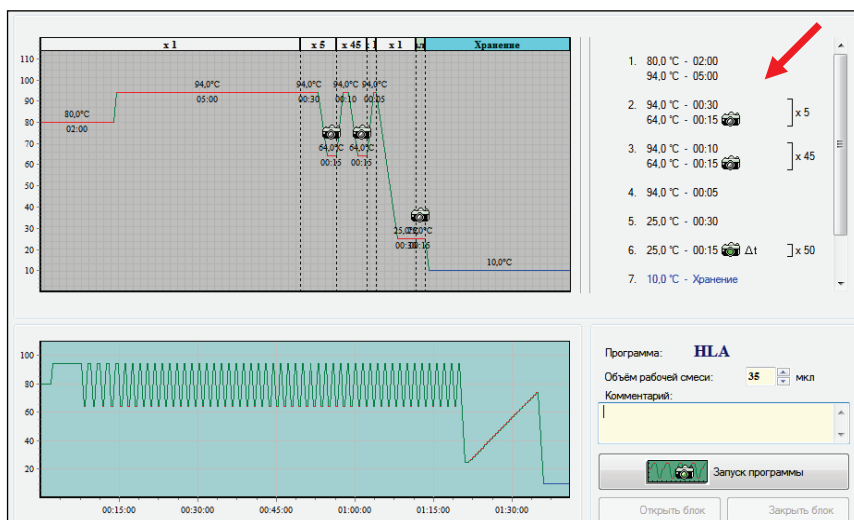
	№	Идентификатор	Тест	Fam	Hex	Rox	Cy5
A1	1	Образец_1	DQA1	0301	0501	0201	BK
B1	2			-	-	0401, 0601	BK
C1	3			-	-	0101, 0102, 0103	BK
D1	4			-	-	0103, 0102, 0101	BK
E1	5	Образец_2	DQA1	0301	0501	0201	BK
F1	6			-	-	0401, 0601	BK
G1	7			-	-	0101, 0102, 0103	BK
H1	8			-	-	0103, 0102, 0101	BK
A2	9	Образец_3	DQA1	0301	0501	0201	BK
B2	10			-	-	0401, 0601	BK
C2	11			-	-	0101, 0102, 0103	BK
D2	12			-	-	0103, 0102	BK

Если термоблок не заполнен полностью, рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой термоблока.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C			1	5	9	13	17	21	25	29		
D			2	6	10	14	18	22	26	30		
E			3	7	11	15	19	23	27	31		
F			4	8	12	16	20	24	28	32		
G												
H												

7.4.7 Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».

7.4.8 В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации «HLA».



- 7.4.9 Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.
- 7.4.10 Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора (7.3.1)).

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация результатов ПЦР осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

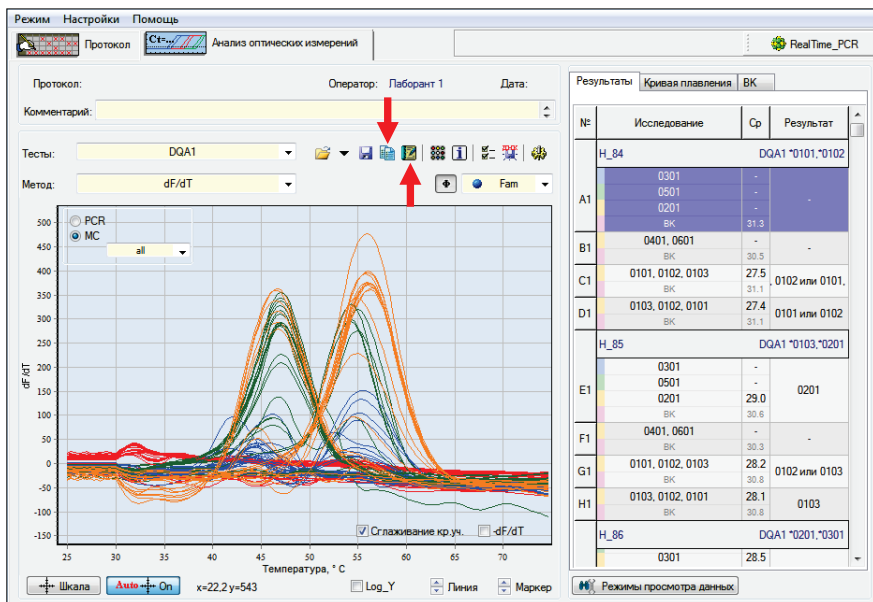
После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла (режим PCR) или от температуры плавления (режим MC) для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторный цикл (C_p) для специфического продукта и ВК, результат по каждому образцу (качественный анализ или анализ кривых плавления для каждой пробирки и генотип для образца).

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.

Для создания лабораторного отчета необходимо нажать кнопку «Отчёт» .

Для получения бланка ответа необходимо нажать кнопку «Бланк ответа» .



Генотипирование HLA II класса

Номер пробирки:
Ф.И.О. пациента:
Пол:
Возраст:
Врач:
Примечание:

Логотип

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: H_84

Наименование исследования	Результат
DQA1	*0101,*0102

ПРИМЕЧАНИЕ ДЛЯ ПАЦИЕНТА

Интерпретация результатов исследования не является диагнозом. Представленная информация предназначена для лечащего врача, ее нельзя использовать для самодиагностики и самолечения. Постановка точного диагноза находится исключительно в компетенции врача и осуществляется на основе совокупности всей возможной информации о пациенте.

Исследование выполнил

Дата
Подпись

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

- 9.1** Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляются автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.
- 9.2** Специфичности гена HLA DQA1 для каждого образца вычисляются программным обеспечением автоматически с учётом результатов по каждой пробирке для этого образца.
- 9.3** Результат по каждой амплификационной пробирке данного образца не является генотипом образца. Результат генотипирования указан в верхней графе таблицы справа рядом с идентификатором образца.

Результаты			
Кривая плавления		ВК	
№	Исследование	Ср	Результат
E3	H_89		DQA1 *0102,*0201
	0301	-	0201
	0501	-	
	0201	29.3	
	ВК	30.9	
F3	0401, 0601	-	-
	ВК	30.5	
G3	0101, 0102, 0103	28.9	0102 или 0103
	ВК	31.5	
H3	0103, 0102, 0101	28.6	0101 или 0102
	ВК	31.2	

На приведённом примере для образца H_89, определён итоговый результат генотипирования: DQA1*0102, *0201.

ВНИМАНИЕ! В случае получения гомозиготного генотипа, для достоверности рекомендуется повторить исследование из того же препарата ДНК.

9.4 В случае получения недостоверных или сомнительных результатов генотипирования («?» или «нд») необходимо либо повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР для этого образца, либо повторное взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

Примечание – Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (KBM).

9.5 Для отрицательных и положительных контрольных образцов должны быть получены результаты, указанные в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты генотипирования отрицательных и положительных контрольных образцов

Идентификатор образца	№ пробирки	Результат по специфике			Результат по ВК	Плавнение	Результат генотипирования
		FAM	HEX	ROX	Сy5		
К-	DQA1-1	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср указан ВК	-	-
	DQA1-2	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQA1-3	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
	DQA1-4	-	-	Ср не указан	Ср указан ВК	Нет	
К+ DQ FAM	DQA1-1	Ср указан 0301	Ср указан 0501	Ср указан 0201	Ср указан ВК	-	?
	DQA1-2	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0401	
	DQA1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0101	
	DQA1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0101 или 0102	
К+ DQ HEX	DQA1-1	Ср указан 0301	Ср указан 0501	Ср указан 0201	Ср указан ВК	-	?
	DQA1-2	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0601	
	DQA1-3	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0102 или 0103	
	DQA1-4	-	-	Ср указан	Ср указан ВК	0103	

Результаты			
Кривая плавления		ВК	
№	Исследование	Ср	Результат
D8	0103, 0102, 0101 ВК	- 32.1	-
K+ DQ_FAM DQA1 ?			
E1	0301	27.7	0301, 0501, 0201
	0501	28.9	
	0201	28.0	
	ВК	30.1	
E2	0401, 0601 ВК	28.0 31.1	0401
E3	0101, 0102, 0103 ВК	30.9 31.0	0101
E4	0103, 0102, 0101 ВК	31.0 31.4	0101 или 0102
K+ DQ_HEX DQA1 ?			
F1	0301	27.8	0301, 0501, 0201
	0501	28.6	
	0201	27.9	
	ВК	30.3	
F2	0401, 0601 ВК	27.7 30.8	0601
F3	0101, 0102, 0103 ВК	30.9 31.3	0102 или 0103
F4	0103, 0102, 0101 ВК	30.9 31.4	0103

Результаты			
Кривая плавления		ВК	
№	Исследование	Ср	Результат
K- DQA1			
A3	0301	-	-
	0501	-	
	0201	-	
	ВК	29.9	
B5	0401, 0601 ВК	- 30.3	-
C7	0101, 0102, 0103 ВК	- 31.8	-
D7	0103, 0102, 0101 ВК	- 31.5	-
K- DQA1			
A4	0301	-	-
	0501	-	
	0201	-	
	ВК	30.9	
B6	0401, 0601 ВК	- 31.0	-
C8	0101, 0102, 0103 ВК	- 31.7	-
D8	0103, 0102, 0101 ВК	- 32.1	-

9.6 При получении для положительных контрольных образцов отрицательных значений, не указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.7 При получении для отрицательного контрольного образца положительных значений, не указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ КОМПЛЕКТА

10.1 Транспортирование

- 10.1.1 Транспортирование комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав комплекта.

Примечание – Допускается транспортировка комплекта реагентов на льду не более 72 часов.

- 10.1.2 Комплекты реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

- 10.2.1 Комплект реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

- 10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности комплекта.

- 10.2.3 Смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности комплекта при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

- 10.2.4 Комплекты реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Комплект реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.

10.3.2 После вскрытия упаковки компоненты комплекта следует хранить при следующих условиях:

- компоненты комплекта, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках;
- полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности комплекта;
- смеси для амплификации следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности комплекта при температуре 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

10.3.3 Комплекты с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании комплекта реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 Комплекты реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-21.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплекта реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности комплекта реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для типирования гена DQA1, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Адрес производителя:

Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС» (ООО «ДНК-Технология ТС»), 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

Код изготовителя указан на этикетке (см. последнюю цифру в серии комплекта)

- 1) ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.
- 2) ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Символы, используемые при маркировке комплекта

	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Предел температуры (Температурный диапазон)
	Содержимого достаточно для проведения n тестов (Количество определений)
	Использовать до
	Код партии (код серии набора)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению
	Номер по каталогу
	Изготовитель
	Не допускать воздействие солнечного света